

GENE-INTRODUCING DEVICE

Patent Number: JP1141582

Publication date: 1989-06-02

Inventor(s): NAKANE YASUO

Applicant(s): SHIMADZU CORP

Requested Patent: JP1141582

Application Number: JP19870300476 19871127

Priority Number(s):

IPC Classification: C12M1/00; C12N13/00; C12N15/00

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To contrive improvement of efficiency for introducing gene by applying high voltage pulse to a cell while pushing the cell to small holes of meshes by dielectrophoresis, giving a temporary membrane breakage to a part of cell bringing into contact with the small holes and introducing DNA from the broken part into the cell.

CONSTITUTION: Meshes 16 having smaller holes than a cell and consisting of high dielectric substance are provided parallel to electrodes between facing electrodes. Dielectrophoresis is given to the cell by generating alternating current voltage in a generator 22 for generating alternating a current voltage and a cell housed between facing electrodes and cell in suspension 14 of DNA are pressed against small holes of meshes 16. Further, in a high voltage pulse generator 24, high voltage pulse is applied between facing electrodes and temporary membrane breakage is given to only cell membrane bringing into contact with small holes and DNA is introduced from the broken part into the cell. As a result, efficiency for introducing DNA is raised and simultaneously survival rate of the cell can be also raised.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑪ 公開特許公報 (A)

平1-141582

⑥Int.Cl.⁴C 12 M 1/00
C 12 N 13/00
15/00

識別記号

府内整理番号

⑪公開 平成1年(1989)6月2日

B-8717-4B
7329-4B
A-8412-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑫発明の名称 遺伝子導入装置

⑬特 願 昭62-300476

⑭出 願 昭62(1987)11月27日

⑮発明者 中根 康雄 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑯出願人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑰代理人 弁理士 野口 繁雄

明細書

1. 発明の名称

遺伝子導入装置

2. 特許請求の範囲

平行対向電極と、前記対向電極間に電極に平行に設けられて細胞より小さい孔をもつ高誘電率物質にてなるメッシュと、前記対向電極間に収容された細胞とDNAの懸濁液中の細胞を前記メッシュの小孔に押しつける手段と、前記対向電極間に高電圧パルスを印加する高電圧パルス発生器とを備えた遺伝子導入装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、細胞に電気パルスを与えることによって、細胞外に浮遊しているDNAを細胞内に取り込ませる装置に関するものである。

(従来の技術)

第7回に概略的に示されるように、対向電極2, 4間に細胞6を置き、電極2, 4間に電界Eを印加したとする。電界Eの方向と細胞6の表面上の

任意の点Qとのなす角をθとすると、細胞膜当り、近似的に

$$V = (3/2) r E \cos \theta \quad \dots \dots (1)$$

なる電位差Vが生じることが知られている。rは細胞6の半径である。

この電位差Vが0.5~3ボルトになると、細胞に一過的膜破壊が生じて細胞膜の透過性が増加し、細胞6外に浮遊しているDNAが細胞6内に取り込まれる。

(発明が解決しようとする問題点)

DNAの導入確率は、(1)式からも分かるように、DNAの大きさによって著しく異なる。

また、DNAの導入確率を増加させるためには、電界Eを大きくすればよいが、その場合、一過的膜破壊が生じる領域が大きくなり、細胞の生存率が低下する。

本発明はDNAの導入効率を上げるとともに、細胞の生存率も上げることのできるDNA導入装置を提供することを目的とするものである。

(問題点を解決するための手段)

実施例を示す第1図と第4図を参照して説明すると、本発明の遺伝子導入装置は、平行対向電極8, 10, 42, 44と、その対向電極間に電極に平行に設けられて細胞より小さい孔をもつ高誘電率物質にてなるメッシュ16と、対向電極間に収容された細胞とDNAの懸濁液中の細胞をメッシュの小孔に押しつける手段22, 30, 32と、対向電極間に高電圧パルスを印加する高電圧パルス発生器40とを備えている。

(作用)

誘電電気泳動や遠心力によってメッシュ16の小孔18に細胞15を押しつけながら高電圧パルスを印加すると、電気力線が小孔18に集中し、細胞15が小孔18に接している部分で一過的膜破壊が生じ、その部分からDNAが細胞15内に導入される。

(実施例)

第1図は一実施例を表わす。

8, 10は一対の対向した平行電極であり、ガラス板12上に接着されている。一対の電極8,

10, ガラス板12及び図には示されていないが電極8, 10の両側部を封止する絕縁部材によって両電極8, 10間に細胞懸濁液14が収容される。細胞懸濁液14中には細胞とDNAが懸濁している。

電極8, 10の間に高電圧パルスを印加するためには、メッシュ16が設けられている。メッシュ16はセラミックスや樹脂など高誘電率物質にて形成され、第2図に示されるように細胞よりも小さい孔18が多数設けられている。メッシュ16の孔18の直径は、動物細胞を扱う場合には2~3μm程度が適当であり、植物細胞の場合は20~30μm程度が適当である。

電極8, 10には細胞懸濁液14に電界を印加するために電源装置20が接続されている。電源装置20には細胞を誘電電気泳動(Dielectrophoresis)させるための交流電圧を発生する交流電圧発生器22と、細胞に一過的膜破壊を起こさせるための高電圧を発生する高電圧パルス発生器24と、交流電圧と高電圧パルスを重疊して印加する

出力回路26とが備えられている。電極8, 10に交流電圧を印加するのは、細胞をメッシュ16の小孔に押しつけるためであり、交流電圧発生器22はその手段を構成する。

次に、本実施例の動作について説明する。

電極間に細胞懸濁液14を入れ、電極8, 10間に交流電圧を印加する。メッシュ16は細胞懸濁液14より誘電率の高い物質であるので、電気力線28は第2図に示されるように孔18に集中し、不均一世界が発生する。この電気力線の不均一性により細胞表面の正負の電荷量にアンバランスが生じ、誘電電気泳動現象によって細胞はメッシュ16の孔18のほうに引き寄せられる。第3図は細胞15が孔18に引きつけられて押しつけられた状態を表わしている。

細胞15を孔18に押しつけた状態で高電圧パルスを重疊して印加する。高電圧も孔18に集中し、孔18と接する細胞膜のみに一過的膜破壊が生じ、その孔からDNAが取り込まれる。

第4図は他の実施例を表わす。

本実施例は、遠心分離機にチャンバ36を装着し、遠心力によってチャンバ36内の細胞懸濁液中の細胞をチャンバ36内のメッシュに押しつけながら高電圧パルスを印加する実施例である。

30は遠心分離機の回転シャフトであり、モータ32によって回転させられる。34はモータ32の回転を制御する回転制御器である。回転シャフト30にはDNA導入チャンバ36が装着され、回転させられるようになっている。チャンバ36には一対の対向した平行電極が設けられているが、それらの電極間に高電圧パルスを印加するために回転シャフト30にはスリップリング38が設けられ、チャンバ36の電極につながる端子がスリップリング38に接触して電源が供給されるようになっている。スリップリング38には高電圧パルス発生器40が接続されている。スリップリング38に代えて電磁カッピングによって電源を供給するようにしてもよい。

チャンバ36は、第5図に示されるように、容器41の遠心力G方向の先端方向に電極42が設

けられ、基端方向に電極44が設けられている。電極42, 44は対向面が平行であり、かつ、その対向面は遠心力G方向に直交している。電極42, 44間にメッシュ16が電極対向面に平行に設けられている。メッシュ16は第1図の実施例と同様に導電率の高い物質で形成され、細胞より小さい孔18があけられている。

電極42の先端からは端子46が容器41外に突出し、電極44の端子48は蓋50を貫通して容器41外に突出している。端子46, 48はリード線を介して遠心分離機のスリップリング38に接触する端子に接続される。

電極44は容器41に挿入されるようになっており、メッシュ16上から細胞とDNAが懸濁した細胞懸濁液14を注入した後に、電極44が挿入される。容器41は取付け容器52に入れられて遠心分離機に装着される。

本実施例の動作について説明する。

遠心分離機を回転させると細胞懸濁液14中の細胞に遠心力が作用し、第6図に示されるように

細胞15がメッシュ16に押しつけられる。遠心分離機を回転させながら高電圧パルス発生器40から高電圧パルスを印加すると、メッシュ16の小孔18で電気力線が集中し、小孔18部分で細胞15の細胞膜に一過的膜破壊が生じ、DNAが導入される。

(発明の効果)

本発明では高誘電率物質のメッシュの小孔に細胞を押しつけた状態で高電圧パルスを印加し、その小孔部分の細胞膜に一過的膜破壊を生じさせて、DNAの導入を行うようにしたので、細胞膜の破壊箇所が小さく、膜破壊が確実に起こる強さの高電圧パルスを印加してDNAの導入効率を上げても細胞が受けける損傷は小さく、細胞の生存性を高めることができる。

4. 図面の簡単な説明

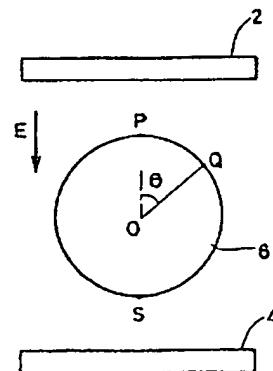
第1図は一実施例を示す構成図、第2図は同実施例のメッシュを示す断面図、第3図はメッシュに細胞が押しつけられた状態を示す断面図、第4図は他の実施例を示す構成図、第5図は同実施例

におけるチャンバを示す断面図、第6図は同実施例で細胞がメッシュに押しつけられた状態を示す断面図、第7図は細胞と電界との関係を示す概略図である。

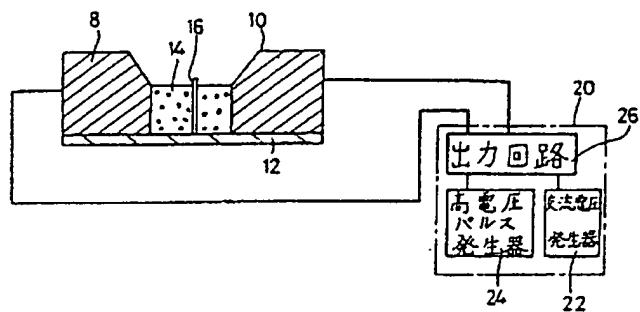
8, 10, 42, 44 ……電極、
14 ……細胞懸濁液、
15 ……細胞、
16 ……メッシュ、
18 ……小孔、
22 ……交流電圧発生器、
24, 40 ……高電圧パルス発生器。

特許出願人 株式会社島津製作所
代理人 井理士 野口繁雄

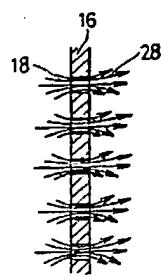
第7図



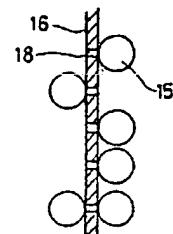
第1図



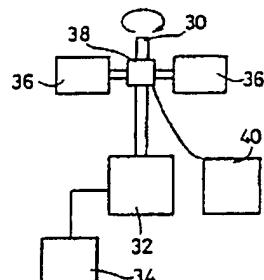
第2図



第3図



第4図



第6図

